

## 出芽酵母Arp6による細胞核内クロマチンドメイン配置の決定とゲノム機能制御に関する研究

著者	吉田 貴人
号	44
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第935号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/60170">http://hdl.handle.net/10097/60170</a>

氏 名(本籍)	よし 吉	だ 田	たか 貴	ひと 人
学 位 の 種 類	博 士 ( 農 学 )			
学 位 記 番 号	農 博 第 9 3 5 号			
学位授与年月日	平 成 20 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学 位 論 文 題 目	出芽酵母 Arp6 による細胞核内クロマチンドメイン配置 の決定とゲノム機能制御に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	准教授	原 田 昌 彦	
	(副 査)	教 授	五 味 勝 也	
		准教授	白 川 仁	
		教 授	西 森 克 彦	

# 論文内容要旨

## 第1章 序論

ゲノムプロジェクトの進展により、様々な生物ゲノムの塩基配列が明らかにされている。しかし、ゲノム配列からだけでは細胞や個体の機能を理解することは不可能である。これらのゲノム配列の情報を応用し有効に利用するためには、遺伝子の発現制御や複製・修復・分配などを制御する「エピジェネティクス」のメカニズムの理解が必要である。エピジェネティック制御の分子基盤はヌクレオソームを基本単位とするクロマチンであり、ゲノム上にはその機能に応じた様々なクロマチンドメインが構築されている。最近になり、個々のゲノム領域が核内のどのような空間的位置に配置されるかにより、その領域のクロマチン構造や機能が制御されることが明らかになってきた。このようなクロマチンドメインの核内配置のエピジェネティック制御における重要性が注目されているが、その分子機構の理解はほとんど進んでいない。クロマチンドメインの核内配置に関する研究は、出芽酵母をモデル系とした解析が最も進んでいる。例えば出芽酵母では一般に、テロメアや HM locus など、遺伝子発現が抑制されたヘテロクロマチン領域は核膜近傍に配置されていることが知られている。また、ほ乳類の間期細胞核内においても、個々の染色体に由来するクロマチンが核内の異なる領域を占めていること、遺伝子密度の高い染色体は核の内部に、遺伝子密度の低い染色体は核の外側に存在していることなどが観察されている。さらに細胞の老化やガン化は、このようなクロマチンの核内配置の異常を伴うことも観察されている。我々は、このような染色体・クロマチンの核内の空間配置にアクチン関連タンパク質 (actin-related protein; Arp) が関与している可能性を考え、解析を行っている。

Arp はアクチンと進化的・構造的に相同性を有しているタンパク質で、出芽酵母からヒトにいたるまで、真核生物に広く存在している。現在 Arp の解析が最も進んでいる出芽酵母においては 10 種類の Arp が同定され、これらはアクチンと相同性の高い順に Arp1~10 に分類されている。我々の研究グループはこのうち Arp4, 5, 6, 7, 8, 9 が細胞核内に局在することを明らかにした。この発見を裏付けるように、近年これら核内 Arp が様々なクロマチン構造変換に関わる複合体に含まれていることが報告されているが、一方で核内 Arp が核構造の分子構築に関わることも予想されている。

出芽酵母 Arp6 は、ATP 依存的にクロマチン構造を変換する複合体である SWR1 クロマチンリモデリング複合体の構成因子であることが報告されている。SWR1 複合体は、Swr1 を酵素サブユニットとし、ヌクレオソーム中のヒストン H2A をそのバリエーションである H2AZ と変換する活性を有している。Arp6 は SWR1 複合体の機能に必須であることが *in vitro* の解析で明らかとなっている。しかし我々は、Arp6 には SWR1 複合体とは別の機能があることを *arp6* 変異株の観察から予想している。そこで、本研究では Arp6 機能を分子レベルで解析し、SWR1 複合体に依存的および非依存的な役割をそれぞれ明らかにすることを目的とした。

## 第2章 SWR1 複合体非依存的な Arp6 機能の検出

Arp6 の SWR1 複合体機能への関与について解析する目的で、*arp6* 欠損株、*swr1* 欠損株を、30°Cあるいは37°CでYPD培地上で培養したところ、37°Cで*arp6* 欠損株は*swr1* 欠損株よりも生育が低下していた(Fig.1)。この結果は、Arp6がSWR1複合体以外にも、何らかの機能を有している可能性を示している。このことを確認するため、ゲル濾過法により Swr1 あるいは Arp6 が含まれる複合体を分画して検出した。Swr1、Arp6ともに約1MDaにSWR1複合体に対応するシグナルが観察された(Fig.2)。Swr1はSWR1複合体としてのみ存在していたが、Arp6は幅広い分子量画分にシグナルが検出され、モノマー(約50kDa)、もしくはそれより少し大きい分子量にも強いシグナルが観察された。また、Swr1を欠失しSWR1複合体が解離した細胞においても、様々な分子量の画分に存在する Arp6 が検出された。これらの結果は、Arp6がSWR1に加えて、他の複合体の構成因子やモノマーとして核内に存在していることを示している。

## 第3章 ゲノム上の Arp6 結合部位の検出・解析

Arp6がSWR1複合体以外にも存在し、SWR1複合体に依存しない機能も有することが示されたが、これまでに Arp6 の機能についての解析はほとんど行われていない。そこで、Arp6の機能を推測するために、広いゲノム領域でのタンパク質の結合を網羅的に解析できる ChIP-chip 解析を用いた(Fig.3)。ChIP-chip 解析は、chromatin immunoprecipitation (ChIP)法と、マイクロアレイチップ(chip)解析を組み合わせた方法である。この方法では、まず通常の ChIP法の原理に従って目的のタンパク質が結合したゲノム領域を回収する。次に、ChIP法ではPCRにより特定の領域の結合を検出するのに対し、ChIP-chip 解析では、回収されたDNAを標識してタイリングアレイチップとのハイブリダイズによって検出する。これにより、目的のタンパク質のクロマチンへの結合を染色体上の広い領域で検出することができる。出芽酵母は、ゲノムの配列がすべて決定され、ORFの位置や複製開始点などのゲノム情報も解析がすすんでいる。そのため、目的のタンパク質が染色体のどのような領域に存在しているかを明らかにすることで、そのタンパク質の機能の推定において非常に多くの情報を得ることができる。本研究で用いたタイリングアレイチップでは、25bpのオリゴDNAにより染色体DNA領域が余すことなくカバーされており、3番、4番、5番、6番右腕染色体のDNA領域におけるタンパク質の結合を約300bpの解像度で検出できる。

ゲノム上の *ARP6* 遺伝子の下流に Flag タグを付加した酵母株を用いて ChIP-chip 解析を行ったところ、Arp6の結合がこれらの染色体上の広い領域に観察された(Fig.4)。Swr1のこれらの染色体上での局在も同様に観察したところ、Arp6の結合部位と約70%一致していた(Table 1)。このことから、ゲノム上の大部分の領域において、Arp6はSWR1複合体の構成因子として

結合して機能していることが示された。Arp6 と Swr1 が同時に結合している領域は、ORF と ORF の間の intergenic region に多く検出され、特に ORF の 5'側で顕著であった(Fig.5A)。このことは、Arp6 が SWR1 複合体の構成因子としてこれらの遺伝子の制御を行っている可能性を示唆している。

多くの Arp6 結合部位が Swr1 と一致していた一方で、Arp6 の結合のみが顕著に観察された領域も存在した。その一つの例がテロメア領域である(Fig.5B, Table 2)。前章での解析ともあわせ、このような領域では Arp6 は SWR1 複合体に依存しない機能を有していることが推定される。SWR1 複合体に依存しない Arp6 の結合をさらに詳しく解析する目的で、*swr1* 欠損株を用いて Arp6 の結合領域を検出した。この株では、Swr1 と一致していた Arp6 の結合の大半が消失していたが、セントロメア領域、テロメア近傍領域などで Arp6 の結合が検出された。このことから、これらの領域では、Arp6 は SWR1 複合体に依存せずに結合し機能していることが予想された。

#### 第4章 テロメア領域の核内配置における Arp6 の関与

Arp6 がテロメア近傍領域に存在していることから、Arp6 のテロメア機能への関与が予想された。核内でテロメアは核膜近傍に配置されることが知られている。そこで、Arp6 の存在の有無によってテロメアの核内配置に変化があるか調べるために、Lac レプレッサー・オペレーターシステムと GFP (LacOp/ LacI-GFP system)を用いて 6 番染色体右腕のテロメア領域(Tel 6R)を可視化し、核内での局在を観察した。LacOp/ LacI-GFP system は、大腸菌の Lac レプレッサー (LacI)が Lac オペレーター配列に非常に強く結合することを利用し、特定のゲノム領域に GFP を結合させ、生細胞中でこの領域の局在やダイナミクスを検出する方法である(Fig.6A)。本研究では核を核膜側から zone1, 2, 3 の面積の等しい三つの領域に分け、Tel 6R がそれぞれの領域に存在している割合を比較した。Tel 6R が核内にランダムに存在するとすれば、それぞれの領域に検出される割合は 33.3%に近くなることが予想される。しかし、出芽酵母のテロメアは核膜近傍に繋ぎ止められて存在していることが知られており、本研究のコントロールでも核膜近傍(zone1)へのテロメアの有意な局在が観察された(Fig.6B)。しかし、*arp6* 欠損株では有意なテロメアの核膜近傍への局在は認められなかった。一方、*swr1* 欠損株ではテロメアの局在はコントロールと大きな差はなかった。これらの結果より、Arp6 はテロメアの核膜への繋ぎ止め (telomere tethering)に必要であり、その機能は SWR1 複合体に依存していないことが示された。

#### 第5章 クロマチンドメインの核内配置における Arp6 の関与

Arp6 の欠失によってテロメアの核膜近傍への局在が観察されなくなること(loss-of-function)

が観察された。ここではさらに、Arp6を人為的に安定に結合させたクロマチンドメインが核膜に繋ぎ止められるようになるか(gain-of-function)について解析を行なった。核内でランダムに存在している *PES4* 近傍に LexA 結合配列を導入し、さらにこの領域を Lac Op/ LacI-GFP system を用いて可視化できる細胞株を用いることで、LexA 融合タンパク質の結合に伴ってこのゲノム領域の核内局在がどのように変化するかを観察した(Fig.7A)。LexA のみを発現させた細胞では、*PES4* 領域の核膜近傍(zone 1)への集積は認められず、この領域が核内でランダムに存在していることが示された。しかし、LexA 融合 Arp6(以下 LexA-Arp6)を発現させた細胞では、*PES4* 領域の核膜近傍(zone1)への局在が有意に増加していた(Fig.7B)。この結果は、LexA-Arp6 の結合によってこの領域が核膜に繋ぎ止められたことを示している。さらに LexA-Arp6 による *PES4* 領域の核膜への繋ぎ止めは *swr1* 欠損株でも同様に観察されたことから、この Arp6 の機能は SWR1 複合体に非依存的であることが示された(Fig.7B)。

これまでに、クロマチンを核膜近傍に局在させる機能を持っているタンパク質として、Sir4、Esc1、Yku70/ 80 などが報告され、これらのタンパク質間で、クロマチンと核膜を繋ぐ機能的な相互作用があることが示唆されている。クロマチンドメインの核膜近傍局在における、Arp6 とこれらのタンパク質との機能的相互作用について解析する目的で、これらの遺伝子を欠失した酵母株を用いて、同様に Arp6 の gain-of-function を調べる実験を行った。その結果、G1 期の細胞において、*yku70* 欠失株、*esc1* 欠失株では、LexA-Arp6 による *PES4* 領域の局在は核膜への繋ぎ止めは観察されたのに対し、*yku70 esc1* の二重欠失株では LexA-Arp6 による繋ぎ止めは観察されず、*PES4* 領域の局在はランダムになった(Fig.7C)。さらに、Yku70, Esc1 のそれぞれが関与する経路において、よりクロマチン側で機能している Sir4 を欠失した株でも同様に繋ぎ止めは観察されなかった(Fig.7C)。これらの結果から、Arp6 はクロマチンドメインの核膜への繋ぎ止めにおいて、Sir4 よりもクロマチン側で機能していることが示唆された(Fig.7D)。

## 第6章 遺伝子発現制御における Arp6 の機能解析

先の ChIP-chip 解析の結果から、ゲノム上のほとんどの領域では Arp6 が SWR1 複合体の構成因子として、多くの遺伝子のプロモーター領域に結合していることを示した。さらに、別のゲノム領域では Arp6 が SWR1 複合体非依存的に結合して、クロマチンドメインの核膜への繋ぎとめに機能していることも示した。出芽酵母からヒトなどの脊椎動物に至るまで、クロマチンドメインの核内配置が遺伝子発現に大きな影響を与えることが知られている。したがって Arp6 は、Swr1 依存のおよび非依存的な二通りの遺伝子発現制御機構に関与することが予想される。このような Arp6 の遺伝子発現制御への関与を調べるために、*arp6* あるいは *swr1* 欠失に伴う遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、*arp6* 欠失株で発現が低下している( $\log_2 < -1.25$ )、すなわち野生株では Arp6 により発現が活性化されている遺伝子

(Arp6 activated gene)が 875 個、また *arp6* 欠失株で発現が上昇している( $\log_2 > 1.25$ )、すなわち野生株では Arp6 により抑制されている遺伝子 (Arp6 repressed gene)が 432 個検出された (Fig.8A)。一方、*swr1* 欠失株のマイクロアレイ解析では Swr1 activated gene が 477 個、Swr1 repressed gene が 340 個検出された (Fig. 8A)。この結果は、Arp6 が Swr1 よりも多くの遺伝子の発現制御に関わっていることを示している。また、Arp6 activated gene のうち Swr1 によっても活性化される遺伝子は 9.9% (87/875)、Arp6 repressed gene のうち Swr1 によっても抑制される遺伝子は 12.3% (53/432)にとどまっていることから、Arp6 が Swr1 非依存性の転写制御機構を有することを強く示唆している。また、個々の遺伝子の *arp6* および *swr1* 欠失株での発現の変化量をグラフで示したところ、Arp6 で特に強く抑制されている一群の遺伝子が存在していることが示された (Fig.8B)。この 23 遺伝子のうち 15 個がリボソームタンパク質をコードする遺伝子 (ribosomal protein gene; RP gene) であった (Table 3)。ChIP-chip 解析の結果からは、Chr.3, 4, 5, 6R に存在する RP gene 27 個のうち、25 個には Arp6 が結合しており、この Arp6 の結合は *swr1* 欠失株でも同様に認められた (Fig.9, Table 4)。このことは、Arp6 が Swr1 非依存的に RP gene 領域に結合して、遺伝子発現を抑制していることを示している。

リボソームは細胞内のタンパク質メタボリズムの中心的な役割を果たし、その構成因子である RP は細胞増殖や環境要因によって厳密に発現が制御され、また細胞老化への関与も報告されている。試験管内の培養では、細胞増殖のごく初期に RP gene の発現はピークを迎え、その後は発現は抑制に転じる。LexA-Arp6 によって核膜近傍に局在させた *PES4* 遺伝子の発現を定量 RT-PCR で解析したところ、核膜近傍への局在に伴って *PES4* 遺伝子の発現抑制が観察された (Fig.10)。この結果は、Arp6 結合によるクロマチン領域の核膜への繋ぎとめがこれらの遺伝子の発現抑制に関与している可能性を示唆している。

## 第7章 総合考察

ゲノムのエピジェネティック制御におけるクロマチンドメインの核内配置の重要性については、序論で述べたとおりであるが、その分子機構解析は、世界的に見てもまだ始まったばかりである。そのようななかで、細胞核のアクチン関連タンパク質 Arp6 に関して本研究で得られた結果は、下に示したいくつかの点で大きな意義がある。

- ① 細胞核内の Arp は、これまでクロマチン構造変換複合体の構成因子としての機能のみが報告されていたが、少なくとも Arp6 にはこのような複合体に依存しない機能があることを発見したこと。
- ② 細胞質のアクチンや Arp が細胞骨格の形成に中心的な役割を示すことから、核内の Arp と核構造との関連が予想されていたが、本研究が初めて Arp6 がクロマチンドメインの空間配置という核の分子構築に関与することを示したこと。

- ③ Arp6 が SWR1 複合体に依存したクロマチン構造変換を介した経路だけでなく、SWR1 複合体機能に依存しない経路も含めた二つの機構で遺伝子発現制御に関わることを発見したこと。
- ④ 細胞増殖や環境応答において重要な役割を果たすリボソーム遺伝子が、Arp6 によって転写制御されており、それがリボソーム遺伝子の核内配置の決定を介したものである可能性を示したこと。

これまで核内のクロマチンドメインの空間配置の解析については、出芽酵母の系を用いた研究が最も成果をあげている。しかし、出芽酵母でクロマチンドメインの空間配置に関与することが示されたタンパク質については、ヒトなどの脊椎動物ではそれらのオルソログが存在しない、あるいは保存性が低いなどの問題があり、これまで真核生物に普遍的な機構の解明には結びつかなかった。しかし、Arp6 では、その存在が脊椎動物にまで確認され、進化的な保存性も高い。このことは、本研究で明らかにされた Arp6 のクロマチンドメインの空間配置のメカニズムが、真核生物に普遍的なものである可能性を強く示唆している。実際に、当研究室で大淵が、ニワトリの Arp6 遺伝子を破壊した細胞を用いて間期核内の染色体配置を観察したところ、通常は転写不活性な染色体が核周辺部に存在するのに対し、Arp6 破壊細胞では染色体配置がランダムになっていた(投稿準備中)。今後は、このニワトリ Arp6 破壊細胞の解析も合わせて行うほか、SWR1 複合体以外の Arp6 を含む複合体の精製や構成因子の同定により、Arp6 のクロマチンドメイン配置に関する分子機構をさらに詳細に解明してゆきたいと考えている。

エピジェネティック制御の分子機構を解明することは、ゲノム機能の理解のみならず、発生や分化の理解や、それらの再生医療などの分野への応用には欠くことができない。クロマチンドメインの空間配置の機構の解明はまだ始まったばかりであり、本研究で明らかになった Arp6 の分子機構や今後の Arp6 の研究が、エピジェネティックおよびその応用における役割は極めて大きいと確信している。



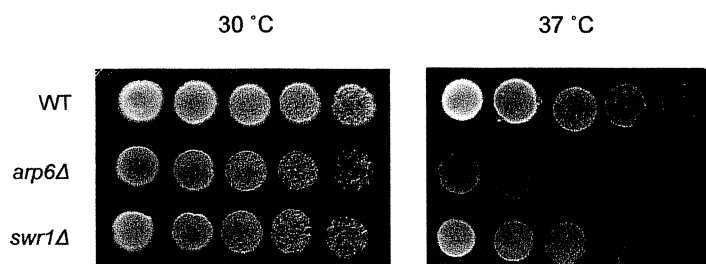


Fig.1. *arp6*-deleted (*arp6Δ*) mutant caused severer growth defect at 37 °C than *swr1*-deletion (*swr1Δ*). Serial 10-fold dilutions of the indicated strains; WT, *arp6Δ* and *swr1Δ* were spotted and grown on YPD in 30 °C and 37 °C.

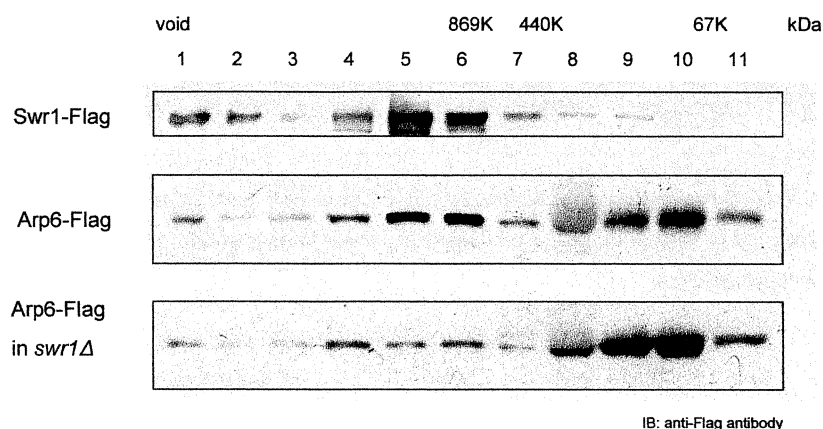


Fig.2. Sizing column (Superose6) analysis of Arp6-complexes. Extracts from cells expressing Arp6-Flag under wild-type and *swr1Δ* background were fractionated on a Superose6 column, and Arp6-Flag in the fractions was detected on a Western blot with anti-Flag antibody (middle and bottom panels). Extracts from cells expressing Swr1-Flag was fractionated as well and was detected with an anti-Flag antibody (top panel).

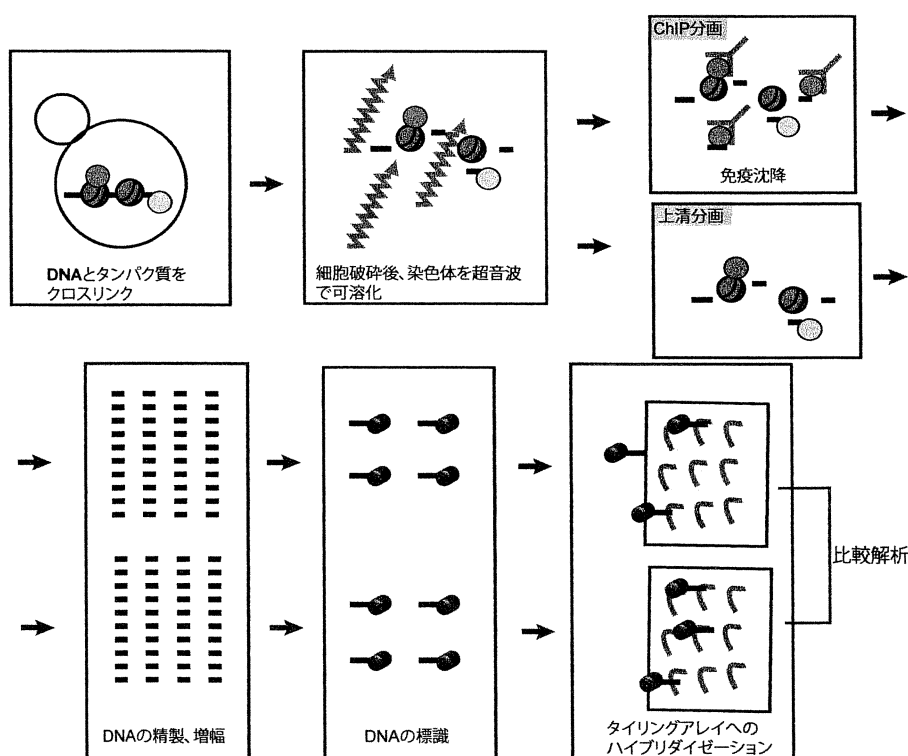


Fig.3. Schematic procedures of ChIP (chromatin immunoprecipitation)-chip analysis.



	Chr3 (1323)	Chr4(4857)	Chr5 (1848)	Chr6R (413)	total (8441)
Arp6 の結合部位	297(22%)	803(17%)	316(17%)	82(20%)	1498(18%)
Swr1 の結合部位	358(27%)	1076(22%)	438(24%)	100(24%)	1972(23%)
Swr1 の結合と一致する部位	220(74%)	551(69%)	229(72%)	61(74%)	1061(71%)

Table 1. Correlation of localization of Arp6 and Swr1 on budding yeast chromosomes.

		Chr3L (32) Chr3R (34)	Chr4L (4) Chr4R (13)	Chr5L (15) Chr5R (13)	Chr6R (34)	Total (145)
SWR1	Arp6 の結合部位	1 (3 %) 3 (9 %)	1 (25%) 1 (8%)	3 (20%) 0 (0%)	7 (21%)	16 (11%)
	Swr1 の結合と一致するArp6 の結合部位	0 (0%) 3 (9%)	0 (0%) 0 (0%)	3 (20%) 0 (0%)	2 (6%)	7 (5%)
<i>swr1Δ</i>	Arp6 の結合部位	3 (9%) 4 (12%)	0 (0%) 5 (38%)	0 (0%) 1 (8%)	9 (26%)	22 (15%)

Table 2. Localization of Arp6 in 10 kb subtelomere zones.

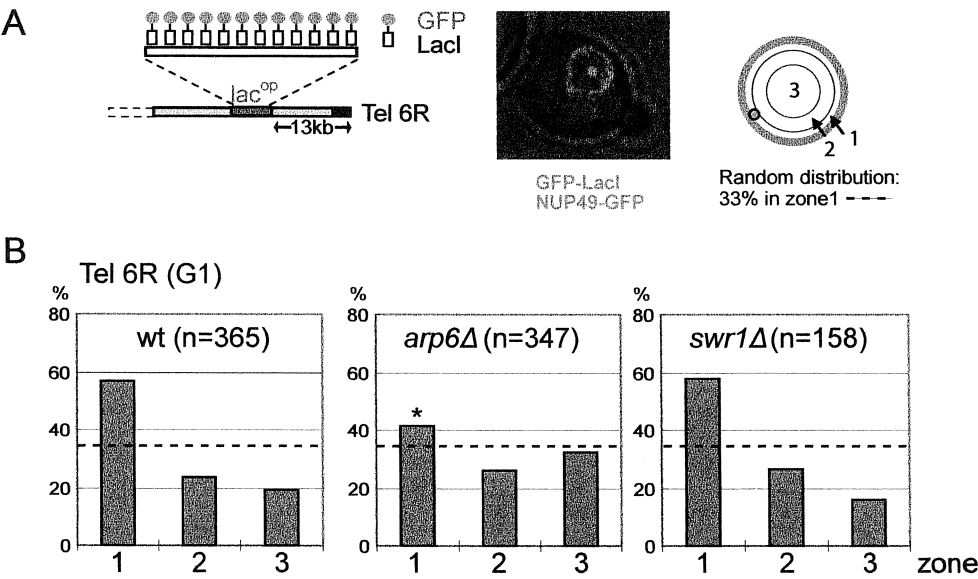


Fig.6. Arp6 is required for the perinuclear targeting of a native telomere.

(A) Tel 6R was tagged by inserting lac operators at the indicated region. The lac<sup>op</sup> array was visualized by binding a GFP-lac repressor fusion, and the nuclear envelope is visualized through a Nup49-GFP fusion. The position of Tel 6R was mapped to one of three concentric zones of equal surface in wild-type (WT), *arp6Δ*, and *swr1Δ* cells. (B) Tel 6R positions were scored in the indicated deletion strains. Bar graphs present the percentage of spots (y-axis) per zone (x-axis) is shown for G1 phase cells. The dotted bar at 33% indicates a random distribution. An asterisk indicates the value of the zone1 which is indistinguishable from a random distribution ( $p>0.05$ ).

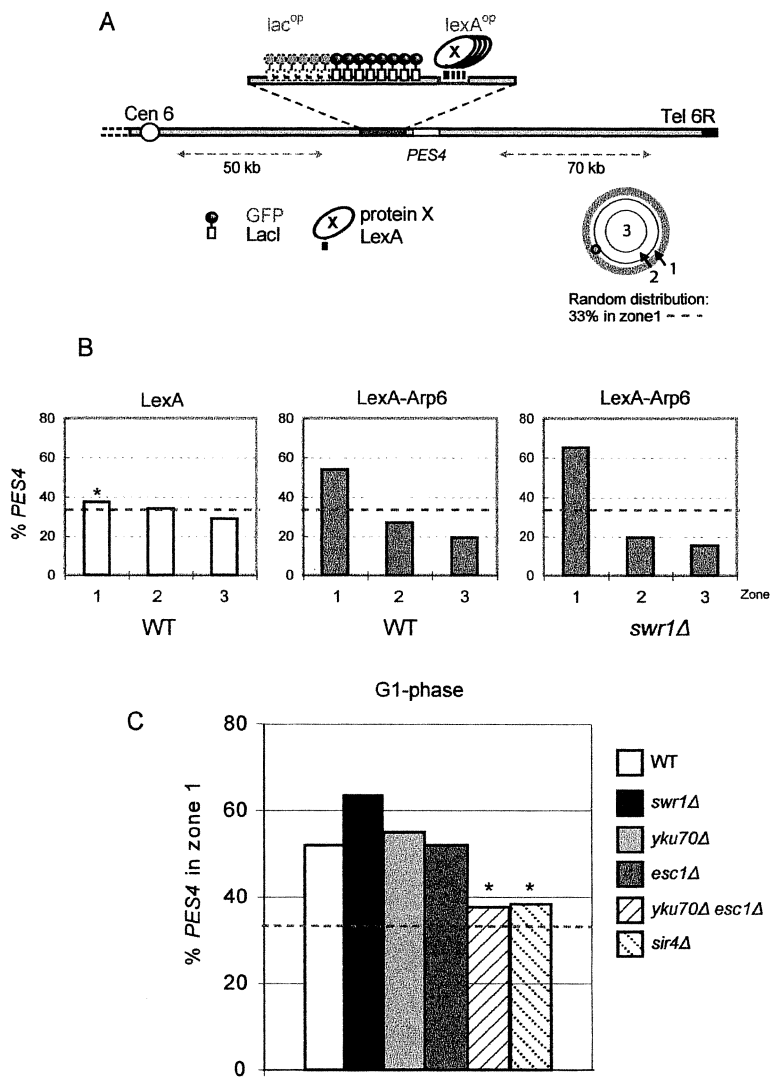


Fig.7. Perinuclear anchoring activity of Arp6 and its requirement of Sir4. (A) The ability of a LexA fusion to cause the redistribution of the *lac<sup>op</sup>*-tagged *PES4* locus bearing LexA binding sites, was tested. *PES4* is located 70 kb from Tel6R. Positional scoring was performed as in Fig.6. (B) LexA alone (white bars) or a LexA-Arp6 fusion (grey bars) was expressed in WT and in isogenic strains bearing disruptions of *swr1Δ*. (C) The position of *PES4* were scored in *yku70Δ*, *esc1Δ*, *sir4Δ*, and *yku70Δesc1Δ* as in B. Only zone 1 values are compared. Asterisks indicate that the values of the zone 1 are indistinguishable from a random distribution ( $p>0.05$ ). (D) Putative scheme of Arp6 anchoring pathway.

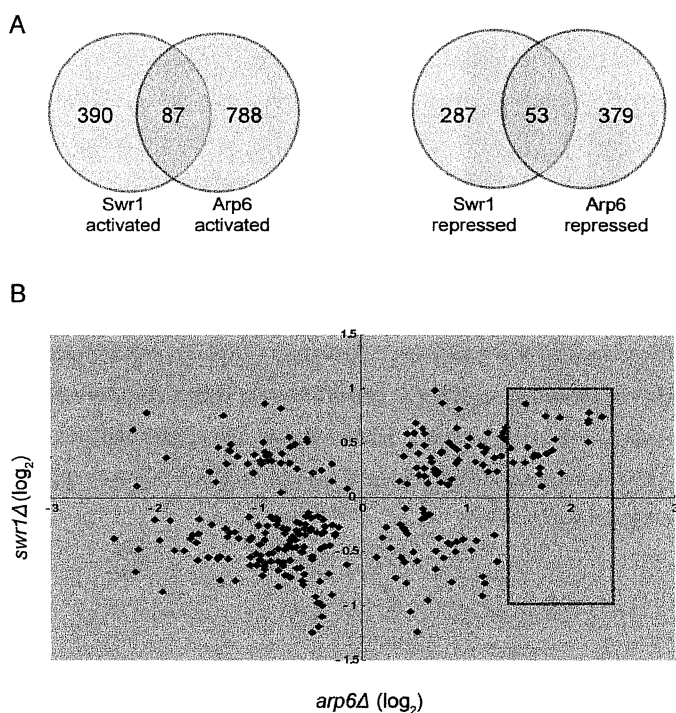


Fig.8. Involvement of Arp6 in transcriptional regulation. Microarray analysis was repeated at least three times for each strains, and the statistical difference were determined by t-test. Difference with  $p<0.05$  was considered significant. (A) The Venn diagrams illustrate the degree of overlap between genes whose RNA levels were changed by 1.25-fold in *arp6Δ* and *swr1Δ* mutants. (B) Genes whose transcriptional changes were statistically significant ( $p<0.05$ ) both in *arp6Δ* and *swr1Δ* cells were plotted according to their  $\log_2$  ratios. The red square represents genes whose transcription was noticeably activated in *arp6Δ* cells.

locus	gene name	log <sub>2</sub> ratio in <i>arp6</i>	log <sub>2</sub> ratio in <i>swr1</i>	function
YDL081C	<i>RPP1</i>	2.31	0.75	ribosomal protein
YOR167C	<i>RPS28A</i>	2.19	0.78	ribosomal protein
YOR248W	-	2.19	0.72	unknown
YGL030W	<i>RPL30</i>	2.18	0.51	ribosomal protein
YHR021C	<i>RRM3</i>	2.18	0.69	DNA helicase
YDL083C	<i>RPS16B</i>	1.91	0.23	ribosomal protein
YJR123W	<i>RPS5</i>	1.90	0.73	ribosomal protein
YPR078C	-	1.85	0.54	unknown
YDL130W	<i>RPP1B</i>	1.83	0.44	ribosomal protein
YJR145C	<i>RPS4A</i>	1.77	0.41	ribosomal protein
YPL163C	<i>SVS1</i>	1.77	0.75	serine and threonine rich protein
YLR264W	<i>RPS28B</i>	1.73	0.10	ribosomal protein
YKL006W	<i>RPL14A</i>	1.71	0.28	ribosomal protein
YHL001W	<i>RPL14B</i>	1.70	0.22	ribosomal protein
YBL087C	<i>RPL23A</i>	1.69	0.39	ribosomal protein
YBL071C	-	1.67	0.40	unknown
YPL220W	<i>RPL1A</i>	1.65	0.38	ribosomal protein
YGL135W	<i>RPL1B</i>	1.60	0.47	ribosomal protein
YOR292C	-	1.57	0.86	unknown
YAR009C	-	1.57	0.32	transposable element gene
YLR157C-B	-	1.48	0.52	transposable element gene
YKL180W	<i>RPL17A</i>	1.45	0.32	ribosomal protein
YHR203C	<i>RPS4B</i>	1.43	0.46	ribosomal protein

Table 3. Scores of selected Arp6-repressed genes in microarray experiments.

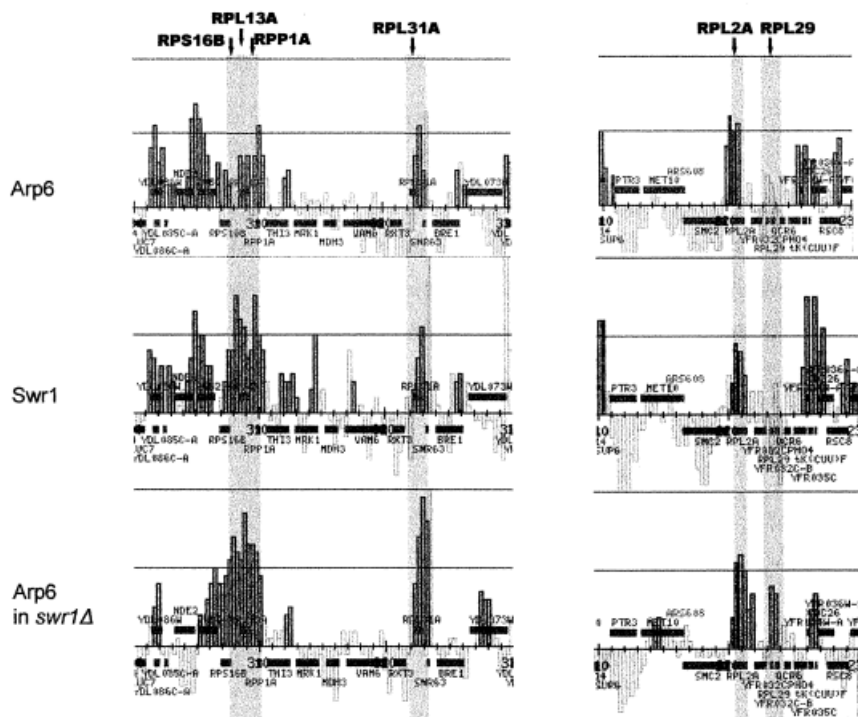


Fig.9. Localization of Arp6 and Swr1 on the region of ribosomal protein (RP) genes. The regions of RP genes are indicated with gray shadow.

		Chr3 (1)	Chr4 (18)	Chr5 (6)	Chr6R (2)	Total (27)
WT	Arp6 binding	1 (100%)	17 (94%)	6 (100%)	1 (50%)	25 (93%)
	Swr1 binding	1 (100%)	17 (94%)	6 (100%)	1 (50%)	25 (93%)
<i>swr1Δ</i>	Arp6 binding	1 (100%)	17 (94%)	6 (100%)	2 (100%)	26 (96%)

Table 4. Binding of Arp6 and Swr1 on ribosomal protein genes.

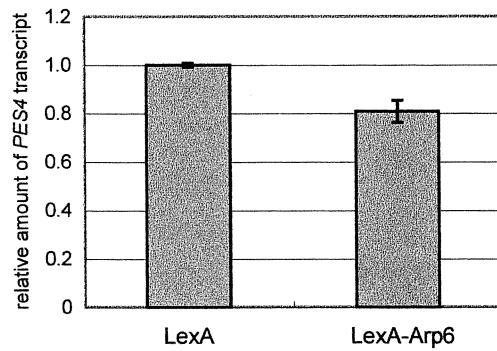
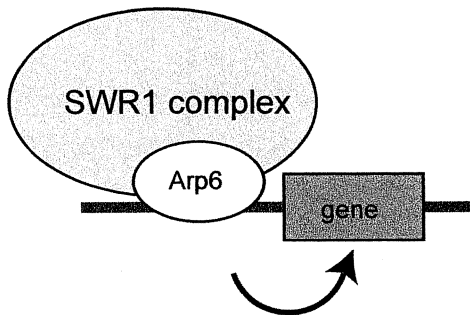


Fig.10. Repression of the *PES4* gene expression according to its anchoring to nuclear envelope. The amount of *PES4* transcript was compared in the presence of LexA or LexA-Arp6. Equal amount of total RNA from strain expressing LexA and LexA-Arp6 was applied to quantitative RT-PCR. The vertical axis shows the relative amount of *PES4* transcript.

#### A. SWR1 complex-dependent function



#### B. SWR1 complex-independent functions

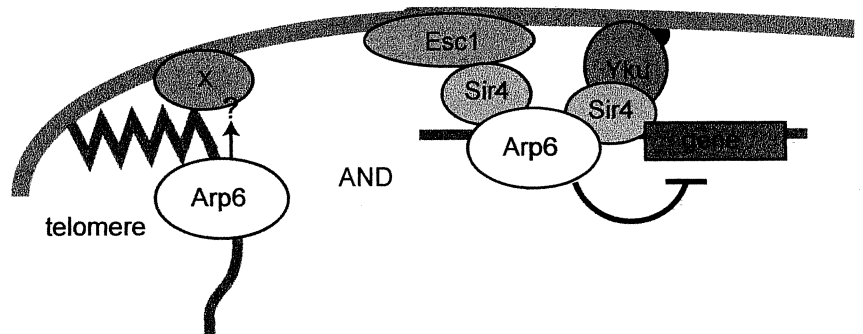


Fig.11. A schematic model of SWR1 complex-dependent and -independent functions of Arp6.

(A) SWR1 complex-dependent function. Arp6 is localized in 5' end of genes as a component of the SWR1 complex and regulates gene expression. (B) SWR1 complex-independent function. Arp6 is localized in telomere regions and is required for the tethering of a natural telomere to nuclear envelope (left). In inner regions of chromosomes, Arp6 has ability to anchor chromatin regions to nuclear envelope through Sir4-mediated pathways. According to the positioning of chromatin regions, Arp6 represses genes including RP genes. We speculate that these functions of Arp6 are conserved in vertebrates.

## 論文審査結果要旨

真核生物において、ゲノムの機能はクロマチンや細胞核の構造により制御されており、これはエピジェネティック制御と呼ばれる。しかし、エピジェネティック制御の分子機構については不明な点が多く残されている。アクチン関連タンパク質 (actin-related protein ; Arp) は、アクチンに進化的・構造的に関連する一群のタンパク質であり、アクチンと Arp によりアクチンファミリーが形成される。アクチンのほとんどが細胞質に存在するのに対し、複数の Arp 分子種は細胞核に局在することから、エピジェネティック制御における Arp の役割が注目されている。本研究では出芽酵母の細胞核に局在する Arp である Arp6 の機能解析を行ない、以下のことを明らかにした。

Arp6 はこれまで SWR1 クロマチンリモデリング複合体の機能に必須な構成因子としての機能のみが報告されていたが、Arp6 欠失株の表現形の解析から Arp6 には SWR1 複合体に依存しない機能も存在することを示した。

また、ChIP (chromatin immunoprecipitation) -chip 解析により Arp6 および Swr1 のゲノムへの結合部位を網羅的に解析したところ、Arp6 は遺伝子上流域に SWR1 複合体の構成因子として結合するほか、Swr1 非依存的にテロメア近傍などに結合することを示した。このテロメアへの Arp6 の結合は、テロメアヘテロクロマチンの核膜近傍への局在に必要であった。

さらに人為的に Arp6 をゲノムに結合させることによって、そのゲノム領域を核膜近傍に配置することが可能となった。このような結果から、アクチンファミリーが細胞核の構築に関わることを始めて明らかにした。以上の Arp6 の性質が遺伝子発現に及ぼす影響をマイクロアレイの結果に基づいて解析したところ、Arp6 は SWR1 複合体の構成因子として遺伝子発現制御に関わるばかりでなく、SWR1 複合体に依存しない経路においても、遺伝子発現制御に関与することを示した。さらに、Arp6 によって発現制御を受ける遺伝子として一群のリボソームタンパク質遺伝子を同定した。リボソームタンパク質遺伝子の発現制御は細胞増殖や環境応答において重要な役割を果たしているが、Arp6 によりリボソームタンパク質遺伝子の核内局在が決定されることによってその転写が制御される可能性を示した。Arp6 の存在は真核生物で保存されて存在しており、その機能の普遍性も指摘されている。したがって、本研究によって明らかになった Arp6 の機能は、エピジェネティック制御の分子機構の解明に大きく貢献し、将来的には発生・分化の分子機構や再生医学などの分野への応用も期待される。

以上のことから審査員一同は、本研究成果は博士 (農学) の学位を授与するに値する研究であると認定した。